

Interleukin-1 induced synthesis and secretion of phospholipase A₂ in cultured rabbit annulus fibrosus and articular chondrocytes

著者	本城 昌
発行年	1998-03-24
その他の言語のタイトル	ウサギの椎間板線維輪および関節に由来する培養軟骨細胞におけるホスホリパーゼA ₂ のインターロイキン-1による誘導とその分泌 ウサギ ノ ツイカンバン センイリン オヨビ カンセツ ニ ユライスル バイヨウ ナンコツ サイボウ ニ オケル ホスホリパーゼ A2 ノ インターロイキン 1 ニ ヨル ユウドウ ト ソノ ブンピツ
URL	http://hdl.handle.net/10422/2469

氏名・(本籍)	本 城 昌 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第265号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学 位 論 文 題 目	Interleukin-1 Induced Synthesis and Secretion of Phospholipase A ₂ in Cultured Rabbit Annulus Fibrosus and Articular Chondrocytes (ウサギの椎間板線維輪および関節に由来する培養軟骨細胞におけるホスホリパーゼA ₂ のインターロイキン-1による誘導とその分泌)

審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
	副査 教授	堀 池 喜八郎
	副査 教授	福 田 眞 輔

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

Ⅱ型ホスホリパーゼA₂ (以下PLA₂と略す) はアラキドン酸カスケードに関与するなど炎症を誘起・増強する作用を持つため炎症と関連して研究されてきた。しかし、最近、宮原らによりヒトの正常椎間板の軟骨細胞の細胞質に高レベルのⅡ型PLA₂が存在することが明らかにされた。この結果は本酵素が椎間板のhomeostasisを保つために重要な生理的役割をはたしている可能性を強く示唆している。

本研究には、Ⅱ型PLA₂の軟骨組織における生理的・病理的役割を解明すべく、ウサギ椎間板線維輪および関節の軟骨細胞を単層培養し、培養軟骨細胞でのPLA₂の合成・分泌の機構を検討する。

【方 法】

(1) 軟骨細胞の培養：日本白色家兎 (6-8週令、体重0.8-1.0kg、オス) の胸椎と腰椎の椎間板から線維輪中層のみを採取し、トリプシンとコラーゲナーゼで処理後、ナイロンメッシュでろ過し、線維輪軟骨細胞を得た。同様に、膝関節から関節軟骨細胞を採取した。軟骨細胞を、マイクロプレート (ウェル直径22mm) に 5×10^4 cells/well の密度で加え、10%ウシ胎児血清 (FBS)、1%ペニシリン、1%ストレプトマイシンを含むHam's F12培地中 (3 ml/well) で7-10日間培養した。培地は3日おきに交換した。組織化学的に調べるときは、4-chamberガラススライド (Nunc) で培養した。(2) 軟骨細胞の刺激：コンフルエントになった培養軟骨細胞を1%FBSを含むHam's F12培地で洗浄後、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、グルコース、あるいはポリエチレングリコールなどを含む同培地中で必要時間培養した。(3) PLA₂活性測定：1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (0.8mM) のコール酸 (5 mM) との混合ミセルを基質として、0.1M Tris-HCl, pH8.5, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ 中でCa²⁺依存性PLA₂活性を測定した。遊離オレイン酸をアダム試薬でラベル後、HPLCで分析・定量した。(3) プロスタグランジンE₂ (PGE₂) の定量：培地中のPGE₂濃度はCayman Chemical社のEIA kitを用いて定量した。(4) 組織化学：ウサギ抗ラットⅡ型PLA₂ポリクローナル抗体を用い、免疫組織化学的に培養細胞および組織中のⅡ型PLA₂の局在を調べた。

【結 果】

(1) 培養線維輪軟骨細胞はトルイジンブルーで強く染色され、プロテオグリカンを盛んに合成・分泌することが確認できた。また、本細胞は多量のPGE₂を分泌した。(2) 培養線維輪軟骨細胞はFBS (1-10%) 単独の存在下では低いPLA₂活性しか示さなかった。しかし、IL-1 β を培地に加えると細胞のPLA₂活性は5時間以内に10倍に増大し、40時間後に最大になった。一方、培地中に分泌されたPLA₂活性はIL-1 β 添加後約10時間して増大し始め、以後時間とともにほぼ直線的に増加した。細胞のPLA₂活性は分泌された活性より約3倍高かった。(3) 免疫組織染色から、Ⅱ型PLA₂は

線維輪組織中では軟骨細胞の細胞質に局在したが、IL-1 β で刺激された培養線維輪軟骨細胞では核と細胞質の両方に局在した。(4) 培養関節軟骨細胞は培養線維輪軟骨細胞とほぼ同じ性質を示した。

【考 察】

(1) 正常椎間板の軟骨細胞には高レベルⅡ型PLA₂が存在するが、線維輪軟骨細胞をその生理的環境から培養条件下に移すと極く微量のPLA₂しか自発的に産生しなかった。この結果は、本酵素の合成・分泌が機械的なストレスなどの椎間板の機能とリンクした生理的刺激により調節されていることを強く示唆している。(2) 培養条件下でも、低レベルのⅡ型PLA₂しか存在しないのに、線維輪軟骨細胞は多量のPGE₂を分泌した。このPGE₂合成には他の型のPLA₂ (cPLA₂やCa²⁺非依存性PLA₂) が主として関与していると考えられ、Ⅱ型PLA₂がアラキドン酸カスケードとは異なる経路で生理的役割を果たしていることを示唆している。(3) IL-1 β は培養線維輪軟骨細胞におけるⅡ型PLA₂の合成・分泌を強く促進した。その経時変化の解析から、新たに合成されたⅡ型PLA₂はまず細胞質および核に蓄積され、その後細胞外に分泌されることが示唆された。(4) 関節軟骨ではⅡ型PLA₂は炎症を増強する病理的役割がある。培養条件下では、線維輪軟骨細胞は関節軟骨細胞とよく似ていた。この結果は、本酵素が椎間板においても関節と同様の病理的役割を果たす可能性を示している。

【結 論】

Ⅱ型PLA₂は軟骨マトリックスの合成・分解に関与する様々な物質の細胞内輸送や分泌の調節に関わっている可能性がある。本酵素の合成・分泌の生理的調節因子の解明が必要である。

論文審査の結果の要旨

ⅡA型ホスホリパーゼA₂ (Ⅱ型PLA₂) は椎間板で大量に発現している。本研究は、軟骨細胞におけるⅡ型PLA₂の役割を解明すべく、ウサギの椎間板線維輪および関節軟骨の軟骨細胞の培養細胞を用いて、PLA₂の生合成・分泌の機構を検討したものであり、以下の結果を得ている。

線維輪軟骨細胞は多量のPGE₂を分泌しているが、生理的環境とは異なりPLA₂活性は低い。インターロイキン-1 β の刺激で細胞中PLA₂活性は5時間以内に10倍に増大するが、分泌は10時間後である。Ⅱ型PLA₂は組織中では細胞質に局在するが、培養細胞では核にも局在する。培養関節軟骨細胞も線維輪軟骨細胞と同様な性質に示す。これらの結果は、椎間板軟骨細胞でのⅡ型PLA₂の合成・分泌における機械的ストレスの重要性、PGE₂合成への他の型のPLA₂の関与、PLA₂の細胞質や核への蓄積後の分泌を示唆している。

本研究は椎間板軟骨細胞におけるⅡ型PLA₂の産生・分泌の動態を初めて明らかにしたものであり、博士(医学)の学位に値するものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年1月30日実施の論文内容と、それに関連した試問を受け、合格と認められたものである。